



PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 9/02, 9/08, 9/96, A23L 1/015, 1/03, 1/211, 3/3571, A61K 7/48, 38/44	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/38095 (43) Date de publication internationale: 16 octobre 1997 (16.10.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00603 (22) Date de dépôt international: 3 avril 1997 (03.04.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/04165 3 avril 1996 (03.04.96) FR (71) Déposant: COLETICA [FR/FR]; 32, rue Saint-Jean-de-Dieu, F-69007 Lyon (FR). (72) Inventeurs: BRESSON-RIVAL, Delphine; 25 bis, rue Challemel-Lacour, F-69007 Lyon (FR). BOIVIN, Patrick; 13, rue des Etangs, F-54850 Messein (FR). LINDEN, Guy; 21, place Saint-Malo, F-54180 Heillecourt (FR). PERRIER, Eric; Quartier Saint-Martin, F-38138 Les-Côtes-d'Arey (FR). HUMBERT, Gérard; 11, rue Paul-Valéry, F-54140 Jarville-la-Malgrange (FR). (74) Mandataires: PORTAL, Gérard etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR).		(81) Etats désignés: JP, KR, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: COMPLEX SUPEROXIDE DISMUTASE PRODUCT (54) Titre: PRODUIT COMPLEXE A BASE DE SUPEROXYDE DISMUTASE (57) Abstract <p>A superoxide dismutase, or SOD, is disclosed. Germinated plant seeds are used in accordance with the invention as a source of superoxide dismutase which can thereafter be complexed with a peroxidase and a enzyme cofactor. Cosmetic, pharmaceutical or agri-food compositions having anti-free radical activity can thus be obtained.</p> (57) Abrégé <p>L'invention concerne une superoxyde dismutase ou SOD. Selon l'invention, on utilise des graines de végétaux germées comme source de superoxyde dismutase que l'on peut ensuite complexer par une peroxydase avec un cofacteur enzymatique. L'invention permet de préparer des compositions cosmétiques, pharmaceutiques ou agroalimentaires à activité antiradicalaire.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brsil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun			PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

PRODUIT COMPLEXE A BASE DE SUPEROXIDE DISMUTASE

La présente invention concerne un produit complexe à base de SOD, et
5 compositions cosmétiques, pharmaceutiques ou agroalimentaires le contenant, et un procédé d'extraction.

La présente invention concerne encore un procédé d'extraction/
purification d'une superoxyde dismutase à partir de graines de végétaux après
germination, et de sa combinaison avec un agent piègeur de H_2O_2 , en particulier
10 une peroxydase, de préférence accompagnée de son cofacteur enzymatique. Ce complexe enzymatique est très stable et est utilisable dans des compositions notamment cosmétiques, pharmaceutiques ou agroalimentaires.

INTRODUCTION

15 Plus précisément, l'invention vise à obtenir une superoxyde dismutase (en abrégé ci-après SOD) à partir de graines de végétaux germées, c'est-à-dire ayant subi une étape de germination, qui présente une activité enzymatique forte, ainsi qu'une stabilité supérieure lorsque cette SOD préparée après germination des
20 graines de végétaux est utilisée dans des compositions antiradicalaires, en combinaison avec une autre enzyme capable de détruire les sous-produits de la réaction de dismutation des superoxydes, principalement l'eau oxygénée (H_2O_2), telle que catalases ou peroxydases. L'invention trouve ainsi une application avantageuse dans des compositions cosmétiques, des compositions pharmaceutiques ou dermatologiques, ou des compositions agroalimentaires.

25 On sait que les radicaux libres sont des atomes ou des molécules qui comportent un électron non apparié sur leur orbitale externe. Ce sont des composés extrêmement instables qui peuvent réagir avec les molécules les plus stables pour appairer leur électron.

Les radicaux libres oxygénés se forment en permanence dans
30 l'organisme, dans les mitochondries ou lors des processus de phagocytose. Les facteurs physiques tels que l'exposition aux ultraviolets ainsi que l'environnement dans lequel l'homme évolue sont également des facteurs de forte production de radicaux libres au niveau des composés biologiques. Ces facteurs sont, par exemple, la pollution automobile, le tabac, les rayonnements ionisants, etc.

35 Les radicaux libres oxygénés sont formés par réduction partielle de l'oxygène moléculaire. La capture d'un électron par l'oxygène, va générer le radical

superoxyde $O_2^{\cdot-}$. Cet anion est peu réactif mais il peut générer des espèces radicalaires très réactives. La dismutation enzymatique de l'anion superoxyde réalisée par une SOD, conduit à la formation d'eau oxygénée qui en présence de fer ferreux, subit la réaction de Fenton pour former le radical hydroxyle OH^{\cdot} , très réactif.

Du fait de leur grande réactivité, les radicaux libres sont capables de s'attaquer à tous les constituants cellulaires et de provoquer de graves altérations : au niveau de la peau, les radicaux libres, en particulier l'anion superoxyde, ont pour cible majeure le collagène mais également les fibres d'élastine, les glycosaminoglycannes et les protéoglycannes, l'ADN intracellulaire, les phospholipides des membranes cellulaires, etc.

Le collagène et les fibres élastiques captent directement les radicaux libres formés, au prix de dégradations diverses : rupture de chaînes et libération de petits peptides dégradés par des protéases non spécifiques, liaisons interchaînes réduisant l'élasticité.

Aussi, dans le but de faire face aux effets destructeurs des formes activées de l'oxygène, il est devenu de plus en plus nécessaire de préparer des compositions à base d'antioxydants dans tous les domaines, et en particulier en cosmétique, pharmacie ou agroalimentaire. En cosmétique, de telles compositions ont été mises sur le marché et sont dénommées produits antiâge ou anti-vicillissement.

ETAT DE LA TECHNIQUE

Les antioxydants utilisés actuellement en cosmétique ou en pharmacie sont soit des molécules chimiques capteurs de radicaux libres, soit des systèmes enzymatiques dont l'inconvénient majeur est une très mauvaise stabilité même à la température ambiante.

Les capteurs lipophiles utilisés sont généralement la vitamine E et le β -carotène, composants des membranes cellulaires qui les protègent de la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux peroxydes formés.

Les antioxydants hydrophiles utilisés sont généralement constitués par la vitamine C, qui agit dans les milieux aqueux vis-à-vis des radicaux superoxydes et hydroxyles, mais aussi par des cofacteurs enzymatiques comme le glutathion et le zinc. Le glutathion, est le cofacteur de nombreuses enzymes impliquées dans la défense antiradicalaire (telles que glutathion peroxydase, la

glutathion transférase, etc.) tandis que le zinc est le cofacteur de la SOD à cuivre-zinc.

L'enzyme utilisée en cosmétique ou pharmacie est la SOD dont le rôle est d'assurer la destruction quasi-instantanée des radicaux superoxydes potentiellement nuisibles pour l'organisme et les tissus de la peau. La réaction catalysée par la SOD est la dismutation de l'anion superoxyde en eau oxygénée ou peroxyde d'hydrogène selon la réaction chimique suivante :



10

Il existe plusieurs enzymes aussi dénommées isozymes de superoxyde dismutase qui ont été principalement isolées de germe de blé ("wheat germ") et l'homme de l'art pourra se reporter à l'article de Beauchamp publié dans la revue Biochimica et Biophysica Acta, 317 (1973), 50-64. Dans cet article, Beauchamp rapporte avoir isolé trois enzymes SOD, l'une dite SOD Mn, sensible au manganèse qui n'est pas inhibée par du cyanure 0,2mM mais est inactivée par le traitement de Tsuchihashi à base de chloroforme plus éthanol, ainsi que deux autres SOD du type SOD Cu-Zn qui sont inhibées par le cyanure mais non affectées par le traitement avec le chloroforme plus éthanol. Ces dernières contiennent un ion cuivrique Cu^{2+} et un ion Zn^{2+} par protomère et ont un poids moléculaire de l'ordre de 30000 Dalton.

On rappellera que la SOD Cu-Zn, présente au niveau des tissus cutanés, constitue la première ligne de défense enzymatique contre les radicaux libres générés par les ultraviolets. Mais il est intéressant de constater que l'enzyme voit son potentiel de détoxification diminuer fortement après irradiation par les ultraviolets. Cette constatation a, par ailleurs, conduit les professionnels de la cosmétologie ou de la pharmacie à incorporer la SOD dans des formulations afin de diminuer le taux des radicaux libres présents au niveau des tissus cutanés.

Il a été ainsi proposé par la société l'Oréal dans le document US-A-4,129,644 d'utiliser une enzyme superoxyde dismutase dans une composition cosmétique et dans un procédé comportant des applications pour maintenir la structure kératinique de la chevelure ou pour protéger la peau et les cheveux par application d'une telle SOD. La SOD était principalement obtenue à partir de sang de bœuf ou de différentes souches bactériennes (revendications 2 à 5).

La société l'Oréal a encore proposé dans le document WO 92/19224 une composition topique antiradicaux libres à base de SOD d'origines diverses

(animale, humaine, bactérienne, levure ou biotechnologique) et d'un dérivé d'acide phosphonique en tant qu'agent complexant des métaux pour lutter contre le vieillissement cutané et la protection de la peau contre les irradiations en se basant sur la mise en évidence que certains agents complexant inactivateurs de métaux pouvaient, dans certains cas, atténuer la production des radicaux hydroxyles (OH[•]) toxiques.

Il est encore connu par le document FR-A-2 634 125 Nippon une composition de superoxyde dismutase stabilisée comprenant de la SOD, un phosphate, un chlorure de métal alcalin et du saccharose (voir le titre les revendications). La SOD est en fait extraite à partir de sang humain.

Il est encore connu, par le document FR-A-2 693 208 Inocosm, un procédé d'obtention d'une composition enzymatique de SOD d'origine végétale à partir de céréale telle que du germe de blé par extraction à l'aide d'un alcool liquide, élimination des polyphénols à l'aide d'un agent de fixation tel que polyamide ou polyvinylpyrrolidone, lavage puis enfin extraction des protéines et des enzymes à nouveau à l'alcool liquide. L'activité SOD obtenue est très faible et l'utilisation de solvants rend l'extrait de SOD difficile à utiliser.

Jusqu'à présent, la SOD industrielle a été obtenue par extraction à partir d'érythrocytes bovins disponibles en quantité importante dans les abattoirs.

D'autre part, bien qu'il soit connu depuis au moins l'article de Beauchamp et al. dans Biochimica et Biophysica Acta, 317 (1973) pages 50-64, d'extraire la SOD à partir de germes de blé, et qu'au moins un brevet similaire ait été déposé par Inocosm en 1992 (FR-A-2 693 208), la proportion d'extraction en SOD d'origine végétale s'est révélée très faible en raison d'une part d'une faible proportion en SOD dans les germes de céréales et, d'autre part, par l'emploi d'un procédé d'extraction en milieu solvant de faible rendement.

Ainsi, la présente invention a pour but principal de résoudre le nouveau problème technique consistant en la fourniture d'une solution qui permette d'obtenir une SOD d'origine végétale en grande quantité avec un très bon rendement de manière à l'utiliser à l'échelle industrielle, en particulier dans le domaine cosmétique, pharmaceutique ou agroalimentaire.

La présente invention a encore pour but de résoudre le nouveau problème technique consistant en la fourniture d'une solution qui permette d'obtenir une SOD d'origine végétale extrêmement active et également extrêmement stable, de préférence en étant capable de conserver 80 % d'activité pendant 1 mois (35 jours) à température ambiante et une activité de l'ordre de 50 %

à 45°C en permettant ainsi une incorporation efficace dans des compositions anti-radicalaires, notamment dans des compositions cosmétiques, pharmaceutiques ou agroalimentaires.

L'ensemble de ces problèmes techniques a été résolu pour la première fois d'une manière simple, sûre et fiable par la présente invention, ce qui constitue un résultat technique inattendu et non évident pour un homme de l'art.

Ainsi, selon un premier aspect, la présente invention concerne un produit complexe à base de la superoxyde dismutase ou SOD stabilisée par un agent piègeur de H_2O_2 , avantageusement une peroxydase de préférence végétale, avec encore de préférence un cofacteur de peroxydase encore dénommé substrat réducteur spécifique de peroxydase.

De préférence, la SOD est d'origine végétale.

Selon une variante de réalisation, la SOD a été obtenue par extraction de grains de végétaux après germination.

Selon un autre mode de réalisation, les graines de végétaux sont des graines de céréales ou des graines de plantes légumineuses ou des graines de plantes oléagineuses.

Dans le cadre de l'invention, les termes grains ou graines sont équivalents.

Comme céréales, on peut utiliser toutes les céréales, en particulier le seigle, le maïs, le blé ou l'orge, de préférence l'orge, parmi les variétés d'orge utilisables, on peut utiliser des variétés de printemps ou d'hiver. Pour les légumineuses, on utilisera des graines d'une plante légumineuse quelconque mais de préférence les graines de lentille ou de pois. Pour les oléagineuses, on utilisera des graines d'une plante oléagineuse quelconque mais de préférence les graines de soja.

Selon un autre mode de réalisation, la germination précitée est contrôlée, elle est réalisée en atmosphère ou milieu humide aqueux, de préférence en présence d'un agent favorisant la germination, à une température comprise entre 4°C et 50°C, avantageusement à la température ambiante ou à froid pendant un ou plusieurs jours.

Selon un autre mode de réalisation, la quantité d'agents piègeurs de H_2O_2 est suffisante pour piéger l' H_2O_2 formée par la SOD utilisée, lorsque l'agent piègeur de H_2O_2 est une peroxydase, la quantité de peroxydase est comprise entre environ 0,01 et environ 1 unité peroxydase par unité SOD, avantageusement entre 0,01 et 0,5 unité peroxydase par unité SOD.

Selon un autre mode de réalisation, le complexe SOD/agent piègeur de H_2O_2 , en particulier une peroxydase, est stabilisé par un cofacteur enzymatique, en particulier un cofacteur enzymatique de la peroxydase, présent à une concentration comprise entre 0,001M et 1M.

5 Selon un autre mode de réalisation, la peroxydase précitée est choisie parmi le groupe consistant d'une peroxydase de raifort, une lactoperoxydase, une glutathion peroxydase ou d'une peroxydase de moelle épinière ou myelo peroxydase, et le substrat réducteur spécifique de peroxydase est de préférence choisi
10 parmi le glutathion, phénol, guaiacol, pyrogallol, mésitol, acide 3,5-dichloro-2-hydroxybenzène sulfonique (DCHBS), aniline, p-toluidine, o-phénylène diamine, mésidine, acide ascorbique, acide dihydroxymaléique, cytochrome C, iodures, acide urique, phénolphthaléine, acide 2,2'-azido-di(3-éthylbenzo-thiazoline (6) sulfonique (ABTS) et des composés tels que SCN^- , Cl^- , Br^- ou I^- .

15 Selon un autre mode de réalisation, l'agent piègeur de H_2O_2 est une peroxydase végétale, de préférence extraite du radis noir.

 Selon un autre mode de réalisation, le cofacteur de peroxydase précité est choisi parmi le groupe consistant de l'acide urique, acide ascorbique ou l'acide dihydroxymaléique.

20 Selon un autre mode de réalisation, le complexe SOD/agent piègeur de H_2O_2 , en particulier de peroxydase, avec éventuellement cofacteur de peroxydase, est encore stabilisé par au moins un sucre, en particulier un monosaccharide ou un disaccharide, et/ou au moins un polyol en particulier ayant un poids moléculaire comprise entre 50 et 1000 g/mole, notamment à une concentration comprise entre 10 et 50 % en poids de complexe de SOD, sous forme d'extrait brut ou sous forme
25 purifiée.

 Selon un autre mode de réalisation, le produit complexe comprend encore un agent antioxydant avantageusement lipophile, de préférence de la famille des tocophérols et leurs dérivés, en particulier leurs esters, tels que les acétates, linoléates ou même les phosphates, en une quantité efficace antioxydante.

30 D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront aussi clairement à partir des revendications et de la description prise dans son ensemble.

 Selon un deuxième aspect, la présente invention concerne également l'utilisation du complexe à base de SOD tel que défini précédemment comme l'un des principes ou ingrédients actifs d'une composition notamment à activité
35 antiradicaux libres, par exemple une composition cosmétique, pharmaceutique ou agroalimentaire.

Selon un troisième aspect, la présente invention concerne également une composition notamment à activité antiradicaux libres, par exemple composition cosmétique, pharmaceutique ou agroalimentaire, caractérisée en ce qu'elle comprend comme l'un des ingrédients actifs un produit complexe à base de la superoxyde dismutase ou SOD stabilisée par un agent piègeur de H_2O_2 ,
5 avantageusement une peroxydase de préférence végétale, avec encore de préférence un cofacteur de peroxydase encore dénommé substrat réducteur spécifique de peroxydase.

Selon une variante de réalisation avantageuse, la proportion de SOD
10 est comprise entre 0,01 et 10 % en poids du poids de la composition totale.

Dans ce troisième aspect, la proportion d'incorporation est variable et dépendra de l'application envisagée. Généralement, la proportion d'incorporation de SOD sera de 0,01 à 30 % en poids, mieux de 0,1 à 10 % en poids et encore mieux de l'ordre de 1 à 5 %.

15 Les peroxydases catalysent la destruction de l'eau oxygénée (H_2O_2) produite lors de la réaction de dismutation catalysée par la SOD de l'anion superoxyde en eau oxygénée comme rappelé en début de description en présence d'un substrat réducteur spécifique dit cofacteur de peroxydase.

Les peroxydases sont nombreuses et bien connues à l'homme de l'art.
20 Elles sont actuellement extraites à partir de la moelle épinière ou myelo peroxydase, du lait ou lactoperoxydase, des hématies bovines ou éventuellement humaines ou glutathion peroxydase ou encore de préférence selon l'invention à partir du radis noir ou peroxydase de raifort.

Par ailleurs, les substrats réducteurs spécifiques des peroxydases sont
25 bien connus à l'homme de l'art et sont de préférence choisis parmi le glutathion, phénol, guaiacol, pyrogallol, mésitol, acide 3,5-dichloro-2-hydroxybenzène sulfonique (DCHBS), aniline, p-toluidine, o-phénylène diamine, mésidine, acide ascorbique, acide dihydroxymaléique, cytochrome C, iodures, acide urique, phénolphthaléine, acide 2,2'-azido-di(3-éthylbenzo-thiazoline (6) sulfonique)
30 (ABTS) et des composés tels que SCN^- , Cl^- , Br^- ou I^- .

Dans le cadre de l'invention, et notamment pour une application en cosmétique ou en pharmacie ou en agroalimentaire, on préfère réaliser un complexe de SOD avec une peroxydase végétale extraite de préférence du radis noir, avantageusement accompagnée de son cofacteur, constitué de préférence par
35 l'acide urique, l'acide ascorbique ou l'acide dihydroxymaléique.

La quantité de peroxydase rajoutée à la SOD est fonction du taux d'eau oxygénée libérée par la SOD, donc de son activité enzymatique. Le nombre d'unités peroxydases à rajouter à la solution de SOD est comprise entre environ 0,01 et environ 1 unité peroxydase par unité SOD, avantageusement entre 0,01 et 0,5 unité peroxydase par unité SOD.

Le cofacteur enzymatique de la peroxydase tel que précédemment décrit, qui peut être de préférence l'acide urique est rajouté au complexe enzymatique à une concentration comprise entre 0,001 M et 1 M.

Selon une variante de réalisation préférée de l'invention, la SOD ou le complexe SOD/peroxydase/cofacteur de peroxydase peut être encore stabilisé par au moins un sucre et/ou au moins un polyol ajouté à une concentration comprise entre 10 et 50 % en poids de SOD ou du complexe final, sous forme d'extrait brut ou sous forme purifiée.

Comme sucre, on utilisera en particulier un monosaccharide ou un disaccharide et notamment le tréhalose et comme polyol on utilisera en particulier un polyol ayant un poids moléculaire moyen compris entre 50 et 1000 g/mole, par exemple le glycérol, le sorbitol, le maltitol et le mannitol. L'ajout d'un sucre ou d'un polyol permet de stabiliser de manière particulièrement inattendue l'activité de la SOD.

Par ailleurs, selon encore un autre mode de réalisation préféré de l'invention, on ajoute un agent antioxydant avantageusement lipophile, de préférence de la famille des tocophérols et leurs dérivés, tels que leurs esters comme les acétates, linoléates ou même les phosphates car il a été découvert de manière particulièrement inattendue qu'un tel agent antioxydant procure une stabilité accrue à la SOD. Les phosphates tocophérols sont, par exemple, décrits dans le brevet US N°5,387,579 de LVMH RECHERCHE. Ce résultat est particulièrement inattendu étant donné que la stabilité de l'enzyme SOD n'est pas liée à des problèmes d'oxydation et de ce fait le mécanisme d'action est actuellement inconnu. Etant donné que cet agent antioxydant est avantageusement lipophile, celui-ci sera ajouté dans la composition dans une phase huileuse, c'est-à-dire en général dans le cadre de la formation d'une émulsion. La concentration en agent antioxydant sera généralement de 0,01 à 3 %, de préférence de 0,1 à 1 %, en poids par rapport au poids total de la composition finale.

Selon un quatrième aspect, la présente invention concerne encore un procédé d'extraction de superoxyde dismutase ou SOD, caractérisé en ce qu'on utilise comme source des graines de végétaux ayant subi une étape de germination

contrôlée de façon à obtenir une activité SOD maximale au cours de la germination et à extraire l'activité SOD au moment où cette activité SOD est maximale par mise en contact des graines de végétaux avec une atmosphère, ou milieu, humide aqueuse pendant un ou plusieurs jours à la température ambiante, et en ce qu'on

5 réalise une étape d'extraction de la SOD à partir des graines germées comprenant un broyage de la graine germée suivi d'une extraction dans une solution aqueuse à une température comprise entre 4°C et 50°C, de préférence à la température ambiante, pendant une période de temps suffisante pour réaliser l'extraction de la SOD, en général de quelques dizaines de minutes à une ou plusieurs heures, suivi

10 d'une filtration et récupération du filtrat contenant la SOD.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'étape de germination comprend une mise en suspension des graines de végétaux dans une solution aqueuse pendant plusieurs jours à la température ambiante.

Selon un mode de réalisation préféré, cette étape de germination a lieu

15 en présence d'un agent favorisant la germination, encore de préférence constitué par un composé appartenant à la famille des gibberellines.

Selon une variante de réalisation avantageuse du procédé, l'étape de germination est précédée d'une étape de trempe dans une solution aqueuse à température ambiante ou à froid pendant un ou plusieurs jours, par exemple

20 deux jours.

Selon encore une autre variante de réalisation du procédé selon l'invention, l'étape d'extraction de la SOD à partir des graines germées comprend un broyage de la graine germée suivi d'une extraction dans une solution aqueuse tamponnée ayant un pH voisin de 8 à la température ambiante pendant une période

25 de temps suffisante pour réaliser l'extraction de la SOD, en général de quelques dizaines de minutes à une ou plusieurs heures, suivie d'une filtration et récupération du filtrat contenant la SOD.

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé d'extraction, on peut réaliser une purification plus poussée de la SOD par traitement du filtrat avec

30 un agent de précipitation permettant d'éliminer les protéines indésirables incluant les protéases ou encore la lipoxygénase, et récupération de la fraction non précipitée ou constituant le surnageant qui contient la SOD.

Selon une autre variante de réalisation encore plus avantageuse, on peut procéder à une dialyse de la fraction non précipitée contenant la SOD par

35 dialyse contre de l'eau ou une solution aqueuse, avec une membrane ayant de préférence un seuil de coupure compris entre 6000 et 8000 Dalton.

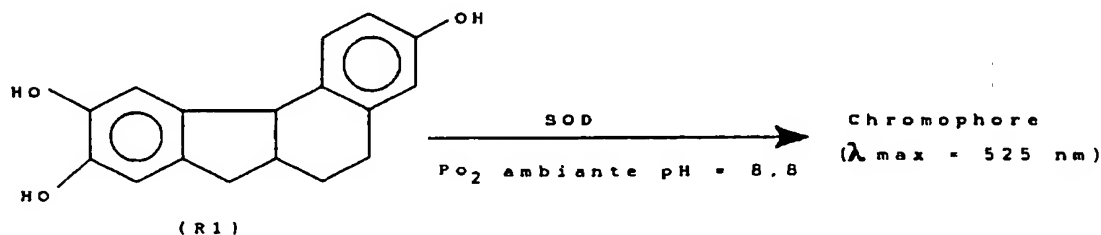
Selon encore une autre variante particulièrement préférée, on peut encore réaliser une purification complémentaire de la solution dialysée en procédant par une purification sur une colonne chromatographique qui sera de préférence constituée dans le cadre de l'invention par une colonne QAE Sephadex à l'aide d'une solution d'élution appropriée.

Selon un autre mode de réalisation avantageux du procédé selon l'invention, on peut réaliser une stabilisation de SOD obtenue directement après l'étape d'extraction précitée, c'est-à-dire avant une purification plus poussée, ou après purification, par ajout d'un agent piègeur de H_2O_2 , comme une peroxydase avec de préférence un cofacteur de peroxydase encore dénommé substrat réducteur spécifique de peroxydase. De préférence, la quantité de peroxydase rajoutée à la SOD exprimée dans un rapport d'unité de peroxydase par rapport aux unités SOD est comprise selon l'invention entre 10 et 400 tandis que pour le cofacteur enzymatique de la peroxydase celui-ci est de préférence présent en une concentration comprise entre 0,001 M et 1 M.

Selon un autre mode de réalisation avantageux du procédé selon l'invention, on peut aussi réaliser une stabilisation de la SOD par ajout après l'étape d'extraction, ou après l'étape de purification, d'au moins un sucre, en particulier un monosaccharide ou un disaccharide et/ou d'au moins un polyol, en particulier un polyol ayant un poids moléculaire moyen compris entre 50 et 1000 g/mole. De préférence, le sucre ou le polyol sera ajouté à une concentration comprise entre 10 et 50 % en poids de la SOD ou du complexe final de SOD, sous forme d'extrait brut ou purifié.

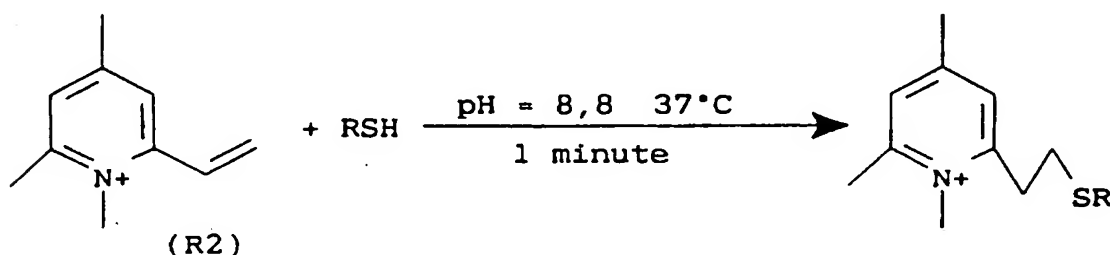
Après extraction sans ou avec purification, on obtient un extrait contenant une activité SOD que l'on peut doser par la méthode bien connue à l'homme de l'art de Nebot C., et al., publiée dans Analytical Biochemistry, 214 (1993) pages 442-451.

Cette méthode de Nebot est basée sur la propriété qu'a tout catalyseur pourvu d'une activité SOD d'accélérer, à pH alcalin, l'autoxydation d'un réactif R1 en un chromophore absorbant la lumière visible, selon la réaction suivante :



La méthode SOD-525 exploite également un deuxième réactif R2 qui permet d'éliminer les interférences majeures dues aux mercaptans qui pourraient être présents dans l'échantillon à analyser, comme par exemple le glutathion, à l'aide d'une réaction d'alkylation très rapide, selon la réaction :

5



La mesure de l'activité SOD est effectuée à un pH de 8,8, ce qui permet une sensibilité optimale du dosage sans inactivation des SOD naturelles connues, telles que par exemple les SOD cuivre-zinc, à manganèse ou à fer.

Il existe un kit de dosage, commercialisé par Oxis International S.A., (94385 BONNEUIL/MARNE, FRANCE), permettant de réaliser un dosage spectrophotométrique de l'activité SOD par cette méthode SOD-525. Ce kit comprend deux réactifs, R1 et R2, et une solution tampon, tampon 3, qui sont respectivement :

R1 : une solution de réactif chromogène R1 dans $3,2 \cdot 10^{-2}$ M HCl de la formule précitée ;

R2 : une solution du réactif R2 piègeur de mercaptans dans le DMSO contenant 25 % (P/V) d'éthylèneglycol ;

tampon 3 : un tampon à pH = 8,8 (à 37°C) contenant 0,11 mM d'acide diéthylène-triaminepentaacétique (DTPA).

Avec ce kit de Oxis International, commercialisé sous le nom kit SOD-525, les mesures spectrophotométriques sont réalisées dans des cuves en verre de 1 cm de trajet optique, à une longueur d'onde de 525 nm. La mesure cinétique de l'évolution de l'absorbance est réalisée pendant 1 minute à 37°C.

Pour chaque mesure, la vitesse de réaction est déterminée en évaluant la pente maximale de la courbe obtenue. Cette pente correspond à une phase d'autoxydation de R1. Les résultats sont exprimés en unités d'absorbance par minute.

Le calcul de l'activité enzymatique est réalisé comme suit :

Soient V_c et V_s les vitesses de réaction correspondant respectivement au contrôle et à l'échantillon. L'activité SOD de l'échantillon à analyser est déterminée en calculant la correspondance entre le rapport expérimental V_s/V_c et l'activité SOD, déduite de l'équation suivante :

5

$$[1] \quad \frac{V_s}{V_c} = 1 + \frac{[SOD]}{a[SOD] + b} \quad \text{avec } a = 0,073 \text{ et } b = 0,93$$

Une unité d'activité SOD-525 définie par Oxis correspond à un rapport V_s/V_c égal à 2, dans les conditions ci-dessus.

10

La valeur obtenue est alors multipliée par le facteur de dilution de l'échantillon (facteur 25) dans la procédure de dosage. Les résultats sont exprimés en unités d'activité SOD-525 par ml d'échantillon.

15

Dans le cadre de l'invention, on mesure l'activité enzymatique SOD après dilution de la solution de SOD obtenue afin de rester dans des valeurs de rapport V_s/V_c permettant d'établir une correspondance correcte avec l'activité SOD.

Dans le cadre de l'invention, on diluera en général la solution de SOD obtenue, en fonction du degré de purification résultant du procédé d'extraction jusqu'à un facteur de 300, afin d'obtenir un rapport V_s/V_c compris entre 1 et 2.

20

L'activité de la solution de SOD est déterminée en tenant compte du facteur de dilution de l'échantillon de la procédure de dosage (facteur 25) et du facteur de dilution de la solution de SOD elle-même (par exemple jusqu'à un facteur de 300).

Les exemples de dosage seront donnés en relation avec les exemples.

25

L'invention couvre également des compositions notamment à activité antiradicaux libres, par exemple des compositions cosmétiques, pharmaceutiques ou agroalimentaires caractérisées en ce qu'elles comprennent comme l'un des ingrédients actifs une SOD végétale obtenue à partir de graines de végétaux ayant subies une étape de germination.

30

D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront clairement à la lumière de la description explicative qui va suivre faite en référence à plusieurs exemples de réalisation de l'invention donnés simplement à titre d'illustration et qui ne sauraient donc en aucune façon limiter la portée de l'invention. Dans les exemples, toutes les proportions sont données en poids sauf

indication contraire. En outre, la première est en degré Celcius et est la température ambiante, et la pression est la pression atmosphérique, sauf indication contraire.

Les exemples font partie intégrante de l'invention et toute caractéristique des exemples qui apparaîtrait nouvelle par rapport à un état de la technique quelconque constitue une caractéristique générale de l'invention revendiquée en tant que telle.

Exemple 1

Extraction de SOD à partir d'orge germé

10 Cette extraction de SOD a lieu de la manière suivante :

a) Germination de l'orge :

On prend de l'orge disponible dans le commerce, par exemple la variété d'orge de printemps Dallas que l'on fait tremper dans une solution aqueuse, par exemple l'eau du robinet ou de préférence l'eau déminéralisée, à froid, par
15 exemple à 15°C, pendant un ou plusieurs jours, par exemple deux jours.

Après ce trempage, qui a pour but de faire gonfler les grains, et de préparer ainsi la germination, on procède à l'étape proprement dite de germination pendant plusieurs jours, par exemple cinq jours, de préférence en présence d'un agent favorisant la germination, tel que l'acide gibbérellique à une concentration de
20 0,1 mg/kg de grain sec de départ.

b) Protocole d'extraction :

Le protocole d'extraction à partir de l'orge germé, aussi dénommé malt est le suivant :

25 Après germination des grains d'orge, le malt est broyé, puis extrait dans une solution aqueuse tampon ayant un pH de l'ordre de 8, qui est de préférence constituée par Tris HCl 50mM + EDTA 1mM, pendant environ 1 h à température ambiante.

L'extrait est ensuite filtré pour éliminer l'écorce, puis centrifugé à
30 4000 G pendant 20 minutes pour éliminer la partie polysaccharidique et on récupère le filtrat ou surnageant sur lequel on détermine l'activité SOD par la méthode précitée de Nebot C., et al. (1993) à l'aide d'un kit commercial de Oxis International, 94385 BONNEUIL/MARNE, FRANCE. On obtient une activité SOD-525/g de matière sèche de départ.

35 L'activité SOD est mesurée après dilution de 1 ml de l'extrait de SOD dans 14 ml d'eau. 40 µl de la solution diluée sont dosés. Le rapport Vs/Vc mesuré

est de 1,95. D'après l'équation (1) précitée, page 9, l'activité SOD est de 0,95 unités SOD-525. L'activité SOD est donc égale à $0,95 \times 25 \times 15 = 356,25$ unités SOD-525/ml soit dans cet exemple 1482 unités SOD-525/g de matière sèche de départ.

5 c) Purification complémentaire :

Le filtrat ou surnageant obtenu à l'issue de la centrifugation ci-dessus est soumis à une précipitation par un agent précipitant éliminant les protéines indésirables telles que les protéases ou encore la lipoxygénase, par exemple du sulfate d'ammonium à une concentration de 390 g/l.

10 On procède à une centrifugation à 4000 G pendant 20 minutes à 20°C pour éliminer le précipité et l'on récupère la fraction liquide constituée par le surnageant qui contient la SOD.

On peut avantageusement dialyser le surnageant pour éliminer des petites molécules et des sels présents en forte concentration ayant un poids moléculaire inférieur à 6000 Dalton. Cette dialyse est effectuée contre de l'eau déminéralisée avec des membranes dont le seuil de coupure est de 6000-8000 Dalton, par exemple 6000 Dalton. En effet, la SOD a un poids moléculaire de l'ordre de 30000, qui ne passe pas dans les pores de telles membranes, ce qui permet d'augmenter l'activité spécifique de l'enzyme.

20 L'activité SOD mesurée sur le dialysat selon la méthode précédente est de 7500 unités SOD-525/g de matière sèche de départ.

d) Purification éventuelle complémentaire sur colonne :

25 A partir du dialysat obtenu à l'étape c) ci-dessus, il est encore possible de réaliser une purification beaucoup plus poussée en travaillant sur colonne chromatographique.

On peut, par exemple, réaliser une chromatographie sur colonne QAE Sephadex, qui a permis de purifier la SOD et d'éliminer toute contamination protéique de l'extrait.

30

Exemple 2

Extraction de SOD à partir de graines de soja

On procède comme décrit à l'exemple 1.

35 On obtient après l'étape b une activité SOD de 180 UI_{SOD}/g de matière sèche de départ.

Exemple 3Extraction de SOD à partir de grains de blé germés

On utilise le même protocole que celui décrit à l'exemple 1 et on mesure l'activité SOD sur le produit d'extraction de l'étape b et l'on obtient

5 116 UI_{SOD}/g de matière sèche de départ.

Exemple 4Extraction de SOD à partir de pois germés

On utilise des pois blancs disponibles dans le commerce (*Pisum sativum*).

10

On utilise le même protocole que celui décrit à l'exemple 1 et on mesure l'activité SOD sur le produit obtenu à l'étape b. On obtient une activité SOD de 80 UI_{SOD}/g de matière sèche de départ.

15 Exemple 5

Mesure de la variation de l'activité SOD à des temps de germination différents ou avec des variétés d'orge différentes en présence ou non d'agent activant la germination tel qu'une molécule issue de la famille des gibberellines

20 Exemple 5-a

Mesure de la variation de l'activité SOD à des temps de germination différents

On a mesuré l'activité SOD à partir de l'orge germé de variété Dallas en faisant varier le temps de germination et en respectant les autres conditions générales du protocole des germinations de l'exemple 1-a.

25 On obtient les résultats indiqués au tableau I ci-après.

TABLEAU I

Activité SOD en UI _{SOD} /g de matière sèche	Temps de germination (jour)
50	1
120	2
290	3
410	4
480	5

On constate à partir des résultats du tableau I que l'activité SOD est plus que doublée après 1 jour de germination et qu'elle est encore une fois plus que doublée au troisième jour de germination et qu'elle augmente encore de manière considérable les quatrième et cinquième jour.

5

Exemple 5-b

Mesure de l'influence de la variété d'orge sur l'activité SOD

On a mesuré l'influence de la variété d'orge sur l'activité SOD et les résultats obtenus sont rapportés au tableau II ci-après. Cette comparaison a été effectuée à temps de germination constant de 5 jours mais sans agent favorisant la germination, les autres conditions du protocole de germination étant identiques à celui de l'exemple 1-a.

10

TABLEAU II

15

Variété d'orge	Activité SOD en UI _{SOD} /g de matière sèche
Natasha	239
Felicie	271
Dallas	214
Magie	218
Puffin	247

20

On constate à partir du tableau II qu'il existe une légère variation dans les résultats obtenus en activité SOD pour diverses variétés d'orge mais que ces résultats sont parfaitement concordant, ce qui prouve la reproductibilité de la procédure de germination selon la présente invention.

Exemple 5-c

Influence de la présence de molécule issue de la famille des gibberellines

25

Il a également été déterminé l'influence de la présence d'un agent favorisant la germination, tel que l'acide gibbéréllique et les résultats sont répertoriés au tableau III. Ces essais ont été réalisés avec de l'orge de printemps variété Natasha selon le protocole de l'exemple 1 avec un temps de germination de 5 jours.

TABLEAU III

Acide gibbérellique	Activité SOD en UI _{SOD} /g de matière sèche
sans	239
avec 0,1 mg/kg de grains	407

On peut constater à partir du tableau III que la présence d'un agent
5 favorisant la germination permet d'accroître de manière particulièrement
inattendue la quantité de SOD produite.

Exemple 6

Stabilisation de la SOD par un polyol

10 La SOD sous forme d'extrait brut obtenue à l'exemple 1 étape b)
conserve 60 % de son activité enzymatique après 46 jours à 20°C.

On a constaté que si l'on ajoute à l'extrait brut 20 % en poids par
rapport à la solution finale de cet extrait brut, c'est-à-dire extrait SOD de l'étape
1-b plus sorbitol à 20 % en poids de la solution finale, on améliore de manière
15 inattendue la stabilité de l'enzyme SOD puisque 76 % de l'activité initiale est
retrouvée après 46 jours à 20°C.

Exemple 7

Stabilisation de la SOD par un sucre

20 On a découvert que l'on pouvait stabiliser l'activité enzymatique de la
SOD par ajout d'un sucre en particulier un monosaccharide ou un disaccharide.
Dans cet exemple, on utilisera le tréhalose.

Si l'on procède comme décrit à l'exemple 6, mais en ajoutant 30 % en
poids de tréhalose à l'extrait brut de SOD obtenue à l'exemple 1 étape b), par
25 rapport au poids de la solution finale, on constate que l'on conserve 75 % d'activité
initiale après 46 jours à 20°C, ce qui constitue une amélioration de stabilité
remarquable.

Exemple 8

Stabilisation de la SOD par une peroxydase et un cofacteur

La solution concentrée en SOD obtenue à l'étape 1-d ou obtenue à une étape antérieure de l'exemple 1 est complexée ou combinée à une autre enzyme capable de détruire l'eau oxygénée formée.

Les enzymes qui peuvent être utilisées dans ce sens peuvent être une catalase qui transforme H_2O_2 en H_2O et O_2 mais la catalase n'est pas utilisée dans la mesure où celle-ci figure dans la liste des produits non autorisés en cosmétologie. On peut aussi utiliser une peroxydase qui catalyse aussi la destruction de H_2O_2 qui nécessite cependant la présence d'un substrat réducteur spécifique ou cofacteur. Les listes de peroxydases et de cofacteurs ont été données dans l'introduction de la description.

Dans le cadre de cet exemple, on utilisera comme peroxydase une peroxydase végétale extraite du radis noir ou peroxydase de raifort, ci-après en abrégé dénommée HRP, combinée à un cofacteur enzymatique constitué par l'acide urique.

Dans le cadre de cet exemple, la quantité de peroxydase rajoutée à la SOD est d'environ 10 unités peroxydases pour 400 unités SOD, l'unité SOD étant mesurée selon la méthode précédemment décrite et l'unité peroxydase étant déterminée par la méthode décrite par Bergmeyer H.U. dans Methods of Enzymatic Analysis (1974), vol. 1, 2nd ed. page 494.

Le cofacteur enzymatique de la peroxydase constitué ici par l'acide urique est rajouté au complexe enzymatique SOD/peroxydase en une concentration comprise entre 0,01 et 1 M, et de préférence 0,5 M.

De préférence, le complexe ainsi formé est encore stabilisé par l'ajout de sucre ou de polyol ajouté à une concentration choisie dans cet exemple à 30 % en poids de la solution finale.

Ce complexe SOD/peroxydase/cofacteur peut être utilisé tel quel pour formuler des compositions à activité antiradicalaire ou de piégeage des radicaux libres, que ce soit des compositions cosmétiques, pharmaceutiques ou agro-alimentaires ou autres. Ce complexe fait aussi l'objet d'essais de stabilité, de capacité antiradicalaire et de toxicologie objet respectivement des exemples 9, 10 et 11 ci-après.

Exemple 9Essais de stabilité

La stabilité de l'activité enzymatique du complexe formé à l'exemple 8 a été réalisée à 20°C et 45°C respectivement et les résultats obtenus sont répertoriés au tableau IV ci-après.

TABLEAU IV

Jours	Activité SOD Unités SOD-525/ml 20°C	Activité SOD Unités SOD-525/ml 45°C
0	5025	5025
7	4800	4275
11	7575	3575
13	5925	3150
18	4500	2800
20	2475	2400
35	3975	2475

Il ressort du tableau IV que l'activité enzymatique est stable à 20°C pendant 1 mois, car à 35 jours on conserve 80 % de l'activité enzymatique, tandis qu'à 45°C on obtient une chute d'activité de l'ordre de 50 %, ce qui représente une chute d'activité remarquablement faible pour une enzyme à cette température.

On observe ainsi que ce complexe de SOD végétale/peroxydase/cofacteur présente une stabilité remarquable, particulièrement à 45°C, ce qui est inattendu pour un homme de l'art.

Exemple 10Mesure de l'activité antiradicalaire ou de piégeage des radicaux libres

1°. On a utilisé 3 méthodes d'évaluation in vitro du piégeage des radicaux :

a) la première méthode utilise un système enzymatique constitué par la xanthine oxydase qui, en oxydant son substrat, la xanthine, génère des radicaux superoxydes. Ces derniers sont capables de réduire le cytochrome C (Fe^{3+}) en cytochrome C (Fe^{2+}), réaction dont la cinétique peut être suivie par spectrophotométrie UV-visible à 550 nm. Ils sont également les radicaux substrats

des SOD qui peuvent ainsi entrer en compétition avec le cytochrome C pour la capture et l'élimination des radicaux superoxydes. En ajoutant une préparation contenant une activité SOD, cette cinétique de réduction est ralentie. Le calcul de l'activité SOD est réalisé par le calcul du pourcentage d'inhibition de la réduction du cytochrome C par la SOD testée.

Une unité SOD exprimée dans le système international (1 UI_{SOD}) correspond à l'activité nécessaire pour diminuer de 50 % le taux de réduction du cytochrome C, à une température de 25°C et à un pH de 7,8.

L'échantillon à tester est dilué de façon à déterminer les conditions pour lesquelles on obtient 50 % d'inhibition de la réduction du cytochrome C, correspondant à 1 unité système international.

L'activité SOD totale de l'échantillon testé est ensuite déterminée en ramenant le volume d'échantillon dosé au volume total de l'échantillon et en tenant compte du facteur de dilution initial de l'échantillon.

L'activité SOD du complexe formé à l'exemple 8 déterminée par cette méthode est de 4455 unités UI_{SOD}/ml.

b) La seconde méthode est constituée par un kit de dosage commercialisé par la société OXIS INTERNATIONAL, sous le nom commercial kit SOD-525, basée sur la propriété qu'a tout catalyseur pourvu d'une activité SOD, d'accélérer l'autoxydation d'un dérivé catéchol tétracyclique (5, 6, 6a, 11b-tétrahydro-3, 9, 10-trihydroxybenzofluorène).

Cette méthode de dosage permet de mesurer l'activité SOD sous forme d'unité SOD-525 qui est définie comme la quantité de dismutase qui multiplie par 2 le taux d'oxydation du dérivé fluoré.

L'activité SOD du complexe formé à l'exemple 8, mesurée par cette méthode, est de 4375 unités SOD-525/ml

On constate ainsi que les valeurs d'activité SOD obtenues par les deux méthodes sont essentiellement identiques.

c) La troisième méthode utilisée est la Résonance Paramagnétique de l'électron ou en abrégé RPE.

La RPE est une technique permettant de caractériser les états de spin des électrons célibataires des molécules, plus particulièrement utilisée pour caractériser les radicaux libres. L'évaluation de l'activité antiradicalaire du complexe SOD/peroxydase/cofacteur obtenu à l'exemple 8 par RPE, permet de distinguer

l'activité de piégeage des radicaux superoxydes et des radicaux hydroxyles (Rosen G. M. et Rauckman E. J. dans *Methods In Enzymologie* (1984), 105, pages 198–209).

Le temps de vie très court des radicaux libres, environ 10^{-11} seconde pour OH^\cdot , limite la capacité de détection de ces derniers. Pour cette raison, les radicaux O_2^\cdot et OH^\cdot sont mis en évidence grâce à une molécule sonde appelée spin-trap. Cette molécule résonne en présence des radicaux libres et stabilise ces derniers sous forme de complexes présentant un spectre caractéristique détectable en RPE.

L'effet piègeur d'un produit à l'essai est directement mis en évidence par une diminution de l'intensité du signal émis par la molécule spin-trap.

Les mesures RPE sont effectuées avec un spectromètre Bruker ESP 106, à température ambiante ; le spin-trap utilisé est le 5,5-diméthyl-1-pyrroline-1-oxyde (DMPO).

L'anion superoxyde est produit par le système enzymatique xanthine (1,5 mM)/xanthine oxydase (12 mU/ml), en présence de DMPO (80 mM) et éthanol à 50 % (v/v). Le complexe SOD/peroxydase/cofacteur obtenu à l'exemple 8 est dissous dans l'eau ultrapure à diverses concentrations.

Le radical hydroxyle est produit par photolyse (UVB) du peroxyde d'hydrogène à 0,2 % (v/v) en solution aqueuse, en présence de DMPO (160 mM). Le complexe SOD/peroxydase/cofacteur obtenu à l'exemple 8 est dissous dans l'eau ultrapure à diverses concentrations.

Les intensités du signal RPE sont calculées par double intégration de la raie de plus bas champ. Les pourcentages de protection du produit à l'essai sont obtenus à partir des valeurs des témoins sans produit à l'essai.

$$\% \text{ protection} = \left| \frac{S_{\text{produit}} - S_{\text{témoin}}}{S_0 - S_{\text{témoin}}} \right| \times 100$$

S_{produit} : intégration du signal RPE obtenu avec le produit à l'essai ou la référence

$S_{\text{témoin}}$: intégration du signal RPE obtenu avec le témoin

S_0 : intégration du signal RPE obtenu en l'absence de radicaux libres

Effet sur le radical superoxyde

Le complexe SOD/peroxydase/cofacteur obtenu à l'exemple 8 diminue de façon dose-dépendante le signal RPE de l'anion superoxyde. A 5 et 10 % (v/v), le complexe inhibe le signal RPE à 44 % et 54 %.

5

Effet sur le radical hydroxyle

Le complexe SOD/peroxydase/cofacteur obtenu à l'exemple 8 diminue de façon dose-dépendante le signal RPE du radical hydroxyle. A la concentration de 0,3 % (v/v), l'effet est spectaculaire puisqu'il inhibe le signal RPE à 93 %.

10

Le complexe SOD/peroxydase/cofacteur obtenu à l'exemple 8 présente des effets antiradicalaires très intéressants vis-à-vis de l'anion superoxyde et du radical hydroxyle même à des concentrations faibles, généralement employées dans des formulations cosmétiques.

15

2°. On a utilisé une méthode d'évaluation ex vivo de l'activité antiradicalaire sur des fibroblastes humains normaux en culture.

Après irradiation aux UVA, les radicaux libres formés dans une culture de fibroblastes humains sont quantifiés par une méthode appropriée. L'utilisation d'agents antiradicalaires permet de diminuer le stress oxydatif, et le calcul de l'efficacité du complexe SOD végétale/peroxydase/cofacteur selon l'exemple 8 à différentes concentrations est réalisé.

20

Des fibroblastes humains normaux sont incubés pendant 1 heure en présence du complexe SOD végétale/peroxydase/cofacteur selon l'exemple 8, testé à 0,01, 1 et 10 % (v/v) dans l'eau déminéralisée. Les cellules sont soumises à un stress radicalaire provoqué par les rayonnements lumineux UVA (10 J/cm²). Les radicaux libres formés (hydroperoxydes) sont détectés à l'aide d'une sonde appropriée, qui se transforme en présence d'hydroperoxydes, en un dérivé fluorescent quantifiable.

25

Les résultats sont tout d'abord exprimés en unité de fluorescence arbitraire par puits de culture. Puis une efficacité est calculée en appliquant la formule suivante :

30

$$E (\%) = [(FTI - FI) / (FI - FNI)] \times (-100)$$

où :

35

E : Efficacité en pourcentage

FNI : Fluorescence observée avec les Fibroblastes Non Irradiés

FI : Fluorescence observée avec les Fibroblastes Irradiés

FTI : Fluorescence observée avec les Fibroblastes Traités et Irradiés

5 Une solution aqueuse contenant 1 % de complexe SOD végétale/
peroxydase/cofacteur formé selon l'invention est capable de réduire de plus de
80 % les effets néfastes liés à un stress oxydatif généré par les UVA.

Cette efficacité est supérieure à celle obtenue avec un mélange référence
glutathion/vitamine C pourtant reconnu pour être particulièrement efficace, et qui
de plus, présente d'énormes problèmes de stabilité.

10 Dès les plus faibles concentrations d'utilisation, le complexe SOD
végétale/peroxydase/cofacteur selon l'exemple 8 permet donc une protection
efficace des fibroblastes humains, cultivés après un stress oxydatif aux UVA.

15 3°. On a utilisé une méthode d'évaluation in vivo de l'activité antiradicalaire sur les
tissus cutanés de volontaires sains.

Les radicaux libres formés suite à l'irradiation UVA peroxydent les lipides
insaturés des tissus cutanés. Les stripping permettent de prélever les cornéocytes
avec les entités peroxydées. Dans le milieu réactionnel, les peroxydes sont révélés
à l'aide d'une sonde fluorescente qui émet une fluorescence directement
20 proportionnelle au taux de peroxydes présents.

Sept volontaires de sexe féminin, âgés entre 20 et 38 ans possédant un
phototype II ou III, c'est-à-dire possédant une peau caucasienne normale sont
sélectionnés.

25 Trois zones de l'avant bras sont délimitées et deux de ces zones sont
irradiées aux UVA (10 J/cm^2) à l'aide d'une lampe UVA Sun 3000 S®. La trace
rouge fugace obtenue n'est pas visible le jour suivant l'irradiation et aucun
processus inflammatoire n'est observé.

30 Une solution aqueuse contenant 1 % de complexe SOD végétale/
peroxydase/cofacteur formé selon l'invention est appliquée 4 fois à 2 heures
d'intervalle ($2 \mu\text{l/cm}^2$).

24 heures après irradiation aux UVA, un prélèvement de la couche
cornée est effectué par 2 stripping successifs.

Les peroxydes formés sont révélés sur le second stripping à l'aide d'une
sonde fluorescente qui donne une réponse globale au processus de peroxydation.

35 Les résultats sont tout d'abord exprimés en unité de fluorescence
arbitraire. Puis une efficacité est calculée en appliquant la formule suivante :

$$E (\%) = [(ZIT - ZI) / (ZI - ZNI)] \times (-100)$$

où :

E (%) : Efficacité en pourcentage

5 ZIT : Fluorescence mesurée sur la Zone Irradiée Traitée

ZI : Fluorescence mesurée sur la Zone Irradiée

ZNI : Fluorescence mesurée sur la Zone Non Irradiée.

10 Une solution aqueuse contenant 1 % de complexe SOD végétale/ peroxydase/ cofacteur formé selon l'invention est capable de protéger avec une efficacité de 65 %, le stress radicalaire cutané induit par une irradiation UVA.

Exemple 11

Toxicologie

15 Les essais de toxicologie ont été réalisés sur le complexe selon l'invention obtenu à l'exemple 8 sur l'évaluation de l'irritation primaire cutanée chez le lapin (9a), sur l'évaluation de l'irritation oculaire chez le lapin (9b), sur l'absence de toxicité anormale par administration orale unique chez le rat (9c) et par l'étude du pouvoir sensibilisant sur le cobaye (9d).

20

11a- Evaluation de l'irritation primaire cutanée chez le lapin

La préparation obtenue à l'exemple 8 a été appliquée sans dilution à la dose de 0,5 ml sur la peau de 3 lapins selon la méthode préconisée par la directive OCDE n°404 concernant l'étude de "l'effet irritant/ corrosif aigu sur la peau".

25

Les résultats de cet essai ont permis de conclure que la préparation obtenue à l'exemple 8 selon l'invention peut être considérée comme non irritante pour la peau même à l'état non dilué.

11b- Evolution de l'irritation oculaire chez le lapin

30

La même préparation obtenue à l'exemple 8 a été instillée pure en une seule fois, à raison de 0,1 ml, dans l'oeil de 3 lapins selon la méthode préconisée par la directive de l'OCDE n°405 du 24 février 1987 concernant l'étude de "l'effet irritant/corrosif aigu sur les yeux".

35

Les résultats de cet essai permettent de conclure que la préparation obtenue à l'exemple 8 selon l'invention peut être considérée comme non irritante pour les yeux au sens de la directive 91/326 CEE utilisée pure ou sans dilution.

11c- Essai sur l'absence de toxicité anormale par administration orale unique chez le rat

La préparation obtenue à l'exemple 8 selon l'invention a été administrée en une fois par voie orale à la dose de 5 g/kg de poids corporel, à 5 rats mâles et 5 rats femelles selon un protocole inspiré de la directive de l'OCDE n°401 du 24 février 1987 et adapté aux produits cosmétiques.

Les résultats de cet essai permettent de conclure que, dans ces conditions expérimentales, la préparation obtenue à l'exemple 8 selon l'invention ne présente pas de toxicité anormale.

10

11d- Etude du pouvoir sensibilisant chez le cobaye

La solution de complexe de SOD obtenue à l'exemple 8 a fait l'objet d'une recherche de pouvoir sensibilisant selon la méthode de Magnusson et Kligman publiée dans J. invest. Derm. (1969), 52, pages 268-276. Cette solution de complexe de SOD a été appliquée telle quelle sur la peau de 35 cobayes préalablement traités à l'adjuvant de Freund et répartis en 2 lots expérimentaux, respectivement lot témoin et lot traité.

Aucune réaction n'a été notée dans les deux lots expérimentaux.

Les résultats obtenus montrent que le complexe SOD végétale/ peroxydase/cofacteur formé selon l'invention ne provoque l'apparition d'aucune réaction de sensibilisation.

20

Exemple 12

Préparation d'une composition sous forme d'une émulsion cosmétique contenant la préparation SOD végétale/ peroxydase/cofacteur selon l'invention

On incorpore la préparation obtenue à l'exemple 8 selon l'invention dans une crème à une concentration de 5 % en poids par rapport au poids total de cette crème.

Cette crème présente la composition suivante :

30

Nom INCI :

A-	Stearth-2.....	3 %
	Stearth-21.....	2 %
35	Polypropylenglycol-15 stearyl ether	9 %
	Cetecaryl alcohol	2,5 %

B- Butylene glycol4,5 %
 Water.....73,3 %

C- Conservateur comprenant des parabènes et du phenoxyethanol0,5 %

D- Tocopherol.....0,2 %

E- Complexe

SOD végétale/peroxydase/cofacteur selon l'invention de l'exemple 8....5 %

10 L'activité enzymatique dans la crème est mesurée après une séparation des phases aqueuse et huileuse, réalisée dans des conditions spécifiques : 2 g de crème sont dilués 5 fois dans 8 g de tampon Tris (hydroxyméthyl) aminométhane 0,2 M, pH 8,5, puis 10 % de NaCl sont ajoutés. Le mélange est soumis à une agitation violente (du type de celle obtenue à l'aide d'un Ultra-turax) pendant
 15 5 minutes puis centrifugé à 5000 tr/mn pendant 25 minutes. L'activité enzymatique est dosée directement dans la phase aqueuse extraite.

La stabilité de l'activité enzymatique de la préparation obtenue à l'exemple 8 incorporée dans une crème, dont la description est donnée ci-dessus, a été étudiée à 20°C et 45°C pendant 40 jours.

20 Les résultats sont répertoriés dans le tableau V.

TABLEAU V

Jours	Activité SOD du complexe SOD stabilisée selon l'invention obtenue à l'exemple 8 (%) 20°C	Activité SOD du complexe SOD stabilisée selon l'invention obtenue à l'exemple 8 (%) 45°C	Activité SOD de la SOD brute d'extraction obtenue à l'exemple 1 étape b) (non stabilisée) (%) 45°C
0	100	100	100
1	100	100	0
3	89	83	0
6	69	83	0
18	92	64	0
25	70	66	0
40	60	50	0

L'activité enzymatique retrouvée dans la crème après 40 jours à 20°C est de 60 % pour la forme SOD stabilisée. Plus remarquable encore l'activité enzymatique retrouvée dans la crème stockée pendant 40 jours à 45°C est de 50 % alors que la forme non stabilisée ne résiste pas à la température.

- 5 Les études de stabilité du complexe selon l'invention, incorporé dans une crème, montrent que le complexe présente une stabilité remarquable à 20°C et particulièrement inattendue à 45°C.

Exemple 13

- 10 Préparation de complexe de SOD végétale avec diverses peroxydases

Exemple 13A

Complexe SOD/peroxydase de raifort

- 15 On utilise la solution de SOD obtenue à l'étape 1c de l'exemple 1 dans laquelle on introduit un nombre d'unités de peroxydase végétale de raifort, dite HRP, dans un rapport d'unités HRP par rapport aux unités SOD compris entre 10 et 400.

- 20 La préparation de SOD végétale/peroxydase de raifort ainsi obtenue peut être utilisée telle quelle ou de préférence combinée avec un cofacteur enzymatique, par exemple l'acide urique ou l'acide ascorbique ou l'acide dihydroxymaléique.

Exemple 13B

Complexe SOD végétale/peroxydase d'*Arthromyces ramosus*

- 25 On procède comme à l'exemple 13A si ce n'est que l'on utilise une peroxydase obtenue à partir d'*Arthromyces ramosus* disponible dans le commerce, par exemple sous la référence Sigma P 4794.

Exemple 13C

- 30 Complexe SOD végétale/peroxydase de soja

On procède comme décrit à l'exemple 13A si ce n'est que l'on utilise une peroxydase extraite à partir du soja disponible dans le commerce sous la référence Sigma P 1462.

Exemple 14**Stabilisation du complexe SOD végétale/peroxydase/cofacteur avec un sucre ou polyol**

- 5 On améliore la stabilisation du complexe enzymatique SOD végétale/peroxydase/cofacteur obtenu à l'exemple 8 par ajout d'un sucre ou polyol au moins selon les variantes de réalisation suivante :

Exemple 14A**Ajout de glycérol**

- 10 A la préparation obtenue à l'exemple 8 selon l'invention, on rajoute le glycérol à une concentration choisie dans cet exemple à 30 % en poids de la solution finale, sous agitation à température ambiante.

Exemple 14B

15 **Ajout de sorbitol**

On procède comme à l'exemple 14A, si ce n'est que l'on utilise du sorbitol.

Exemple 14C

20 **Ajout de maltitol**

On procède comme à l'exemple 14A, si ce n'est que l'on utilise du maltitol.

Exemple 14D

25 **Ajout de mannitol**

On procède comme à l'exemple 14A, si ce n'est que l'on utilise du mannitol.

Exemple 14E

30 **Ajout de tréhalose**

On procède comme à l'exemple 14A, si ce n'est que l'on utilise du tréhalose.

Exemple 15Formation du complexe enzymatique avec différents cofacteurs de peroxydase

On procède comme décrit à l'exemple 8, si ce n'est que l'on utilise des cofacteurs de peroxydase autres que l'acide urique qui était utilisé à l'exemple 8.

5

Exemple 15AAcide ascorbique

On procède comme décrit à l'exemple 8, si ce n'est que l'on utilise l'acide ascorbique en lieu et place de l'acide urique à une concentration comprise entre 0,01 et 1 M, et de préférence 0,5 M.

10

Exemple 15BAcide dihydroxymaléique

On procède comme décrit à l'exemple 8, si ce n'est que l'on utilise l'acide dihydroxymaléique en lieu et place de l'acide urique, à une concentration comprise entre 0,01 et 1 M, et de préférence 0,5 M.

15

Exemple 16

Composition cosmétique de type émulsion huile-dans-eau, utilisable plus particulièrement pour des préparations cosmétiques antiradicalaires, à visée antiâge, antirides et antistress de la peau

20

On prépare une composition sous forme d'émulsion huile-dans-eau de manière classique à partir des cinq fractions A, B, C, D et E suivantes ayant la composition centésimale indiquée :

25

Nom INCI :

A- Phase huileuse comprenant :

30	Stearth-2	3 %
	Stearth-21	2 %
	Polypropylène glycol-15 stearyl ether.....	9 %
	Cetearyl alcohol.....	2,5 %
35	B- Butylene glycol.....	4,5 %
	Water	73,3 %

C- Conservateur comprenant des parabènes et du phenoxyethanol.....0,5 %

D- Tocopherol.....0,2 %

5 E- Complexe

SOD végétale/peroxydase/cofacteur selon l'invention de l'exemple 85 %

10 Après avoir chauffé les phases grasse et aqueuse à 80°C séparément, on mélange la phase B dans la phase A, puis la phase C, la phase D-et encore la phase E jusqu'à obtenir une émulsion huile-dans-eau.

Exemple 17

Composition pharmaceutique à activité anti-inflammatoire

15 Cette composition pharmaceutique comprend outre un principe actif pharmaceutique classique, une préparation telle qu'obtenue à l'exemple 8 selon l'invention, à raison de 5 % en poids, en mélange avec un excipient pharmaceutiquement acceptable.

Exemple 18

Composition agroalimentaire stabilisée vis-à-vis de l'oxydation

20 Cette composition agroalimentaire présente une stabilité vis-à-vis du rancissement et comprend, outre les principes actifs agroalimentaires classiques, 5 % en poids de préparation obtenue à l'exemple 8 selon l'invention qui sont incorporés en même temps que les autres ingrédients actifs.

REVENDICATIONS

1. Produit complexe à base de superoxyde dismutase ou SOD stabilisée par un agent piègeur de H_2O_2 , avantageusement une peroxydase de préférence
5 végétale, avec encore de préférence un cofacteur de peroxydase encore dénommé substrat réducteur spécifique de peroxydase.

2. Produit complexe selon la revendication 1, caractérisé en ce que la SOD a été obtenue par extraction de graines de végétaux après germination.

3. Produit complexe selon la revendication 2, caractérisé en ce que les
10 graines de végétaux sont des graines de céréales ou des graines de plantes légumineuses ou des graines de plantes oléagineuses.

4. Produit complexe selon la revendication 3, caractérisé en ce que les céréales comprennent le blé ou l'orge, de préférence l'orge, variété de printemps ou d'hiver ; les légumineuses comprennent les graines de lentille ou de pois ; et les
15 oléagineuses comprennent les graines de soja.

5. Produit complexe selon la revendication 2, 3 ou 4, caractérisé en ce que la germination précitée est contrôlée, elle est réalisée en atmosphère ou milieu humide aqueux, de préférence en présence d'un agent favorisant la germination, à une température comprise entre 4°C et 50°C, avantageusement à la température
20 ambiante ou à froid, pendant un ou plusieurs jours.

6. Produit complexe selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la quantité d'agent piègeur de H_2O_2 est suffisante pour piéger l' H_2O_2 formée par la SOD utilisée, lorsque l'agent piègeur de H_2O_2 est une peroxydase, la quantité de peroxydase est comprise entre environ 0,01 et environ
25 1 unité peroxydase par unité SOD, avantageusement entre 0,01 et 0,5 unité peroxydase par unité SOD.

7. Produit complexe selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le complexe SOD/agent piègeur de H_2O_2 , en particulier une peroxydase, est stabilisé par un cofacteur enzymatique, en particulier un cofacteur
30 enzymatique de la peroxydase, présent à une concentration comprise entre 0,001M et 1M.

8. Produit complexe selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la peroxydase précitée est choisie parmi le groupe consistant d'une peroxydase de raifort, une lactoperoxydase, une glutathion peroxydase ou
35 d'une peroxydase de moelle épinière ou myélo peroxydase, et le substrat réducteur spécifique de peroxydase est de préférence choisi parmi le glutathion, phénol,

guaiacol, pyrogallol, mésoitol, acide 3,5-dichloro-2-hydroxybenzène sulfonique (DCHBS), aniline, p-toluidine, o-phénylène diamine, mésidine, acide ascorbique, acide dihydroxymaléique, cytochrome C, iodures, acide urique, phénolphtaléine, acide 2,2'-azido-di(3-éthylbenzo-thiazoline (6) sulfonique (ABTS) et des composés tels que SCN^- , Cl^- , Br^- ou I^- .

9. Produit complexe selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'agent piègeur de H_2O_2 est une peroxydase végétale, de préférence extraite du radis noir.

10. Produit complexe selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le cofacteur de peroxydase précité est choisi parmi le groupe consistant de l'acide urique, l'acide ascorbique ou l'acide dihydroxymaléique.

11. Produit complexe selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le complexe SOD/agent piègeur de H_2O_2 , en particulier de peroxydase, avec éventuellement cofacteur de peroxydase, est encore stabilisé par au moins un sucre, en particulier un monosaccharide ou un disaccharide, et/ou au moins un polyol en particulier ayant un poids moléculaire comprise entre 50 et 1000 g/mole, notamment à une concentration comprise entre 10 et 50 % en poids de complexe de SOD, sous forme d'extrait brut ou sous forme purifiée.

12. Produit complexe selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend encore un agent antioxydant avantageusement lipophile, de préférence de la famille des tocophérols et leurs dérivés, en particulier leurs esters, tels que les acétates, linoléates ou même les phosphates en une quantité efficace antioxydante.

13. Utilisation du complexe à base de SOD tel que défini à l'une quelconque des revendications précédentes comme l'un des principes actifs d'une composition, notamment à activité antiradicaux libres, par exemple une composition cosmétique, pharmaceutique ou agroalimentaire.

14. Composition, notamment à activité antiradicaux libres, par exemple composition cosmétique, pharmaceutique ou agroalimentaire, caractérisée en ce qu'elle comprend comme l'un des principes ou ingrédients actifs une superoxyde dismutase (SOD) stabilisée par un agent piègeur de H_2O_2 , avantageusement une peroxydase de préférence végétale, avec encore de préférence un cofacteur de peroxydase encore dénommé substrat réducteur spécifique de peroxydase.

15. Composition selon la revendication 14, caractérisée en ce que la proportion de SOD est comprise entre 0,01 et 10 % en poids du poids de la composition totale.

5 16. Composition selon la revendication 14, caractérisée en ce que la quantité de peroxydase rajoutée à la SOD est comprise entre environ 0,01 et environ 1 unité peroxydase par unité SOD, avantageusement entre 0,01 et 0,5 unité peroxydase par unité SOD.

10 17. Composition selon l'une des revendications 14 à 16, caractérisée en ce que le cofacteur enzymatique de la peroxydase est présent à une concentration comprise entre 0,001M et 1M.

15 18. Composition selon l'une des revendications 14 à 17, caractérisée en ce que la SOD ou le complexe SOD/agent piègeur de H_2O_2 en particulier peroxydase avec éventuellement un cofacteur de peroxydase est stabilisé par au moins un sucre, en particulier un monosaccharide ou un disaccharide, et/ou au moins un polyol en particulier ayant un poids moléculaire compris entre 50 et 1000 g/mole, notamment à une concentration comprise entre 10 et 50 % en poids de SOD ou du complexe de SOD, sous forme d'extrait brut ou sous forme purifiée.

20 19. Composition selon l'une des revendications 14 à 18, caractérisée en ce qu'on ajoute un agent antioxydant avantageusement lipophile, de préférence de la famille des tocophérols et leurs dérivés, en particulier leurs esters tels que les acétates, linoléates ou même les phosphates, notamment à une concentration de 0,01 à 3 % en poids, mieux de 0,1 à 1 % en poids, par rapport au poids total de la composition finale.

25 20. Composition selon l'une des revendications 14 à 19, caractérisée en ce que la peroxydase précitée est choisie parmi le groupe consistant d'une peroxydase de raifort, une lactoperoxydase, une glutathion peroxydase, une peroxydase de moelle épinière ou myélo peroxydase, et le substrat réducteur spécifique de peroxydase est de préférence choisi parmi le glutathion, phénol, guaiacol, pyrogallol, mésoitol, acide 3,5-dichloro-2-hydroxybenzène sulfonique (DCHBS), aniline, p-toluidine, o-phénylène diamine, mésidine, acide ascorbique, 30 acide dihydroxymaléique, cytochrome C, iodures, acide urique, phénolphtaléine, acide 2,2'-azido-di(3-éthylbenzo-thiazoline (6) sulfonique (ABTS) et des composés tels que SCN^- , Cl^- , Br^- ou I^- .

35 21. Composition selon l'une des revendications 14 à 20, caractérisée en ce que la SOD est extraite de graines de végétaux et est stabilisée par une peroxydase végétale extraite de préférence du radis noir, accompagnée d'un

cofacteur de peroxydase constitué par l'acide urique, l'acide ascorbique ou l'acide dihydroxymaléique.

22. Composition selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que la proportion de SOD est comprise entre 0,1 et 10 % en poids par rapport au poids total de la composition.

23. Composition selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que la proportion de SOD est de l'ordre de 5 % en poids par rapport au poids total de la composition.

24. Procédé d'extraction de superoxyde dismutase ou SOD, caractérisé en ce qu'on utilise comme source des graines de végétaux ayant subi une étape de germination contrôlée de façon à obtenir une activité SOD maximale au cours de la germination et à extraire l'activité SOD au moment où cette activité SOD est maximale par mise en contact des graines de végétaux avec une atmosphère, ou milieu, humide aqueuse pendant un ou plusieurs jours à la température ambiante, et en ce qu'on réalise une étape d'extraction de la SOD à partir des graines germées comprenant un broyage de la graine germée suivi d'une extraction dans une solution aqueuse à une température comprise entre 4°C et 50°C, de préférence à la température ambiante, pendant une période de temps suffisante pour réaliser l'extraction de la SOD, en général de quelques dizaines minutes à une ou plusieurs heures, suivi d'une filtration et récupération du filtrat contenant la SOD.

25. Procédé selon la revendication 24, caractérisé en ce que l'étape de germination est précédée d'une étape de trempage dans une solution aqueuse à température ambiante ou à froid pendant un ou plusieurs jours.

26. Procédé selon la revendication 24 ou 25, caractérisé en ce que l'étape de germination a lieu en présence d'un agent favorisant la germination, encore de préférence constitué par l'acide gibbéréllique.

27. Procédé selon l'une des revendications 24 à 26, caractérisé en ce qu'on réalise une purification plus poussée de la SOD par traitement du filtrat avec un agent de précipitation permettant d'éliminer les puretés indésirables incluant les protéases ou encore la lipoxygénase, et récupération de la fraction non précipitée ou constituant le surnageant qui contient la SOD.

28. Procédé selon la revendication 27, caractérisé en ce qu'on procède à une dialyse de la fraction non précipitée contenant la SOD par dialyse contre de l'eau, avec une membrane ayant de préférence un seuil de coupure compris entre 6000 et 8000 Dalton.

29. Procédé selon la revendication 28, caractérisé en ce qu'on réalise une purification complémentaire de la solution dialysée en procédant par une purification sur colonne chromatographique.

5 30. Procédé selon l'une des revendications 24 à 29, caractérisé en ce qu'on stabilise la SOD par un agent piègeur de H_2O_2 , comme une peroxydase avec de préférence un cofacteur de peroxydase encore dénommé substrat réducteur spécifique de peroxydase.

10 31. Procédé selon l'une des revendications 24 à 30, caractérisé en ce qu'on stabilise la SOD par ajout d'au moins un sucre, en particulier un mono-saccharide ou un disaccharide, et/ou au moins un polyol en particulier ayant un poids moléculaire moyen compris entre 50 et 1000 g/mole.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/00603

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N9/02 C12N9/08 C12N9/96 A23L1/015 A23L1/03
 A23L1/211 A23L3/3571 A61K7/48 A61K38/44

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A23L A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. EXP. BOTANY, vol. 44, no. 258, January 1993, pages 127-132, XP000610443 CAKMAK ET AL.: "Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds" see the whole document	1-3,5,8, 24,25
A	---	14,15, 20,21
X	PLANT PHYSIOL., vol. 59, no. 2, 1977, pages 315-318, XP000610237 GIANNOPOLITIS ET AL.: "Superoxide dismutases. II Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings" see the whole document ---	24,25, 27-29
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 September 1997

Date of mailing of the international search report

24.09.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Gac, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 97/00603

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PHYSIOL. PLANTARUM, vol. 92, no. 3, November 1994, pages 443-450, XP000610458 STRELLER ET AL.: "Four cytosolic-type CuZn-superoxide dismutases in germinating seeds of Pinus sylvestris" see the whole document ---	24-27,29
X	FR 2 693 208 A (LABORATOIRES INOSCOM) 7 January 1994 cited in the application	1-3,8, 11,13, 14,18, 20,21, 30,31 24-27,29
Y	see the whole document ---	
Y	BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, vol. 317, no. 1, 12 July 1973, pages 50-64, XP000610572 BEAUCHAMP ET AL.: "Isoenzymes of superoxide dismutase from wheat germ" cited in the application see the whole document ---	24,27
Y	BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, vol. 1074, no. 2, 8 July 1991, pages 277-283, XP000610204 PUNTARULO ET AL.: "Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination" see the whole document	24,25
A	---	1-4,8, 14,15, 20-22,30
Y	EUR. J. BIOCHEM., vol. 224, no. 1, 15 August 1994, pages 21-28, XP000610708 GIDROL ET AL.: "Accumulation of reactive oxygen species and oxydation of cytokin in germinating soybean seeds" see the whole document	24,25,27
A	---	1-4,8, 14,15, 20-22,30
A	J. AM. SOC. BREWING CHEM., vol. 51, no. 3, 1993, pages 79-83, XP000610441 BAMFORTH ET AL.: "Oxygen and oxygen radicals in malting and brewing : a review" see page 80 - page 81 see page 84, right-hand column ---	1-3,8,9, 12-15, 19-22

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/00603

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HOUGH J.S., BRIGGS D.E: "Malting and brewing science" 1972, CHAPMAN AND HALL LTD, LONDON XP002020869 see page 95 - page 105 in particular pages 95 and 98	24-26
Y	DATABASE CAB ABSTRACTS AN: 940708524, 1994 XP002020870 see abstract & ACTA AGRONOMICA SINICA, vol. 20, no. 3, 1994, pages 347-351, ZENG ET AL.: "The effects of gibberellic acid on factors scavenging active oxygen in the flag leaf of hybrid rice during the later growth stages"	26
A	WO 92 19224 A (L'OREAL) 12 November 1992 cited in the application see page 1, line 19 - line 35 see page 3, line 6 - line 19 see examples 1,6,7	18,31
A	US 3 637 640 A (HUBER W.) 25 January 1972 see the whole document	18,31
A	US 3 773 929 A (HUBER W.) 20 November 1973 see column 10, line 50 - line 70 see column 11 - column 16 see column 20 - column 21	20,21
A	INDIAN J. EXP. BIOL., vol. 17, no. 7, 1979, pages 712-713, XP000610492 AHUJA ET AL.: "Effects of glucose & 2,4-dinitrophenol on the activity of superoxyde dismutase in germinating mung bean" see the whole document	18,31
A	EP 0 437 393 A (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE) 17 July 1991 see page 4 - page 6	19-21
A	DE 24 62 631 A (ANVAR) 27 March 1980 see claims 5-16 see column 8, line 41 - line 54 see column 4 - column 5	20,27-29
A	EP 0 628 629 A (HELIOSYNTHESE) 14 December 1994 see page 3 - page 4	27-29

	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/00603

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 9637 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 96-369738 XP002040201 & RU 2 046 140 (AS. USSR CHEM. BIOL. ASSOC. STOCK CO) , 20 October 1995 see abstract & DATABASE "DERWENT BIOLOGICAL ABSTRACTS", 1995, AN: 96-12520, DIALOG AN = 201749, SLEPYAN: " A method of isolation of an enzyme complex from culturable plant cells- ginseng and polistsias cell culture for e.g. superoxide-dismutase, catalase and peroxidase preparation" see abstract</p> <p>---</p>	1,6, 13-17
A	<p>DATABASE WPI Week 9433 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 94-269370 XP002040215 see abstract & JP 06 199 694 A (KATO...) 19 July 1994 see abstract</p> <p>---</p>	1,8,10, 12-14, 19,20
A	<p>WO 94 19493 A (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 1 September 1994</p> <p>See page 51 lines 10,11,20 and 22 See page 55 lines 5,6,14-25</p> <p>---</p>	1,8-10, 12-14, 19,20
A	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 0, no. 0 & JP 55 087712 A (HAGIWARA YOSHIHIDE), 2 July 1980, see abstract</p> <p>---</p>	1,13-15
A	<p>FR 2 611 495 A (COCHAND ET AL.) 9 September 1988 see the whole document</p> <p>---</p>	1,13,14
A	<p>FREE RAD. RES. COMMUN., vol. 15, no. 5, 1991, pages 285-296, XP002040214 SUBRAHMANYAM ET AL.: "Hydroxylation of phenol to hydroquinone catalyzed by a human myeloperoxidase-superoxide complex : possible implications in benzene-induced myelotoxicity" see the whole document</p> <p>-----</p>	1,8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/00603

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2693208 A	07-01-94	NONE	
WO 9219224 A	12-11-92	FR 2675997 A CA 2109424 A EP 0658099 A JP 6507165 T US 5352438 A	06-11-92 04-11-92 21-06-95 11-08-94 04-10-94
US 3637640 A	25-01-72	NONE	
US 3773929 A	20-11-73	NONE	
EP 437393 A	17-07-91	FR 2656874 A AU 641460 B AU 6922091 A DE 69114311 D DE 69114311 T ES 2080918 T IL 96779 A JP 4211366 A US 5179012 A	12-07-91 23-09-93 18-07-91 14-12-95 05-06-96 16-02-96 31-01-96 03-08-92 12-01-93
DE 2462631 A	27-03-80	FR 2225443 A FR 2240277 A AT 348320 B AT 339242 B AU 3055977 A AU 6791974 A BE 813485 A CA 1023285 A CH 619981 A CH 619731 A DE 2417508 A GB 1428898 A GB 1456496 A JP 50040785 A JP 58013147 B NL 7405019 A SE 7801041 A US 3997402 A	08-11-74 07-03-75 12-02-79 10-10-77 02-03-78 16-10-75 09-10-74 27-12-77 31-10-80 15-10-80 07-11-74 17-03-76 24-11-76 14-04-75 11-03-83 18-10-74 27-01-78 14-12-76

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/00603

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 2462631 A		US 4029819 A	14-06-77
		ZA 7402287 A	30-04-75
		CA 1023286 A	27-12-77
		US 3920521 A	18-11-75
EP 628629 A	14-12-94	FR 2706465 A	23-12-94
		AU 6345994 A	15-12-94
		JP 7135970 A	30-05-95
		US 5536654 A	16-07-96
WO 9419493 A	01-09-94	CA 2157041 A	01-09-94
		EP 0686203 A	13-12-95
		JP 8510377 T	05-11-96
FR 2611495 A	09-09-88	NONE	

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE					
CIB 6	C12N9/02 A23L1/211	C12N9/08 A23L3/3571	C12N9/96 A61K7/48	A23L1/015 A61K38/44	A23L1/03
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB					
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE					
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)					
CIB 6 C12N A23L A61K					
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche					
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)					
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS					
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents				no. des revendications visées
X	J. EXP. BOTANY, vol. 44, no. 258, Janvier 1993, pages 127-132, XP000610443 CAKMAK ET AL.: "Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds" voir le document en entier				1-3,5,8, 24,25
A	---				14,15, 20,21
X	PLANT PHYSIOL., vol. 59, no. 2, 1977, pages 315-318, XP000610237 GIANNOPOLITIS ET AL.: "Superoxide dismutases. II Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings" voir le document en entier				24,25, 27-29

-/-					
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents			<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:					
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée			"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée			Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale		
9 Septembre 1997			24.09.97		
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale			Fonctionnaire autorisé		
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016			Gac, G		

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	PHYSIOL. PLANTARUM, vol. 92, no. 3, Novembre 1994, pages 443-450, XP000610458 STRELLER ET AL.: "Four cytosolic-type CuZn-superoxide dismutases in germinating seeds of Pinus sylvestris" voir le document en entier ---	24-27,29
X	FR 2 693 208 A (LABORATOIRES INOSCOM) 7 Janvier 1994 cité dans la demande	1-3,8, 11,13, 14,18, 20,21, 30,31 24-27,29
Y	voir le document en entier ---	
Y	BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, vol. 317, no. 1, 12 Juillet 1973, pages 50-64, XP000610572 BEAUCHAMP ET AL.: "Isoenzymes of superoxide dismutase from wheat germ" cité dans la demande voir le document en entier ---	24,27
Y	BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, vol. 1074, no. 2, 8 Juillet 1991, pages 277-283, XP000610204 PUNTARULO ET AL.: "Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination" voir le document en entier ---	24,25
A	---	1-4,8, 14,15, 20-22,30
Y	EUR. J. BIOCHEM., vol. 224, no. 1, 15 Août 1994, pages 21-28, XP000610708 GIDROL ET AL.: "Accumulation of reactive oxygen species and oxydation of cytokin in germinating soybean seeds" voir le document en entier ---	24,25,27
A	---	1-4,8, 14,15, 20-22,30
A	J. AM. SOC. BREWING CHEM., vol. 51, no. 3, 1993, pages 79-83, XP000610441 BAMFORTH ET AL.: "Oxygen and oxygen radicals in malting and brewing : a review" voir page 80 - page 81 voir page 84, colonne de droite ---	1-3,8,9, 12-15, 19-22

-/--

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	HOUGH J.S., BRIGGS D.E: "Malting and brewing science" 1972, CHAPMAN AND HALL LTD, LONDON XP002020869 voir page 95 - page 105 * surtout pages 95 et 98 *	24-26
Y	DATABASE CAB ABSTRACTS AN: 940708524, 1994 XP002020870 voir abrégé & ACTA AGRONOMICA SINICA, vol. 20, no. 3, 1994, pages 347-351, ZENG ET AL.: "The effects of gibberellic acid on factors scavenging active oxygen in the flag leaf of hybrid rice during the later growth stages"	26
A	WO 92 19224 A (L'OREAL) 12 Novembre 1992 cité dans la demande voir page 1, ligne 19 - ligne 35 voir page 3, ligne 6 - ligne 19 voir exemples 1,6,7	18,31
A	US 3 637 640 A (HUBER W.) 25 Janvier 1972 voir le document en entier	18,31
A	US 3 773 929 A (HUBER W.) 20 Novembre 1973 voir colonne 10, ligne 50 - ligne 70 voir colonne 11 - colonne 16 voir colonne 20 - colonne 21	20,21
A	INDIAN J. EXP. BIOL., vol. 17, no. 7, 1979, pages 712-713, XP000610492 AHUJA ET AL.: "Effects of glucose & 2,4-dinitrophenol on the activity of superoxyde dismutase in germinating mung bean" voir le document en entier	18,31
A	EP 0 437 393 A (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE) 17 Juillet 1991 voir page 4 - page 6	19-21
A	DE 24 62 631 A (ANVAR) 27 Mars 1980 voir revendications 5-16 voir colonne 8, ligne 41 - ligne 54 voir colonne 4 - colonne 5	20,27-29
A	EP 0 628 629 A (HELIOSYNTHESE) 14 Décembre 1994 voir page 3 - page 4	27-29

	-/--	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 97/00603

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 9637 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 96-369738 XP002040201 & RU 2 046 140 (AS. USSR CHEM. BIOL. ASSOC. STOCK CO) , 20 Octobre 1995 voir abrégé & DATABASE "DERWENT BIOLOGICAL ABSTRACTS", 1995, AN: 96-12520, DIALOG AN = 201749, SLEPYAN: " A method of isolation of an enzyme complex from culturable plant cells- ginseng and polistsias cell culture for e.g. superoxide-dismutase, catalase and peroxidase preparation" voir abrégé</p> <p>---</p>	1,6, 13-17
A	<p>DATABASE WPI Week 9433 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 94-269370 XP002040215 voir abrégé & JP 06 199 694 A (KATO...) 19 Juillet 1994 voir abrégé</p> <p>---</p>	1,8,10, 12-14, 19,20
A	<p>WO 94 19493 A (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 1 Septembre 1994</p> <p>See page 51 lines 10,11,20 and 22 See page 55 lines 5,6,14-25</p> <p>---</p>	1,8-10, 12-14, 19,20
A	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 0, no. 0 & JP 55 087712 A (HAGIWARA YOSHIHIDE), 2 Juillet 1980, voir abrégé</p> <p>---</p>	1,13-15
A	<p>FR 2 611 495 A (COCHAND ET AL.) 9 Septembre 1988 voir le document en entier</p> <p>---</p>	1,13,14
A	<p>FREE RAD. RES. COMMUN., vol. 15, no. 5, 1991, pages 285-296, XP002040214 SUBRAHMANYAM ET AL.: "Hydroxylation of phenol to hydroquinone catalyzed by a human myeloperoxidase-superoxide complex : possible implications in benzene-induced myelotoxicity" voir le document en entier</p> <p>-----</p>	1,8

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 97/00603

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2693208 A	07-01-94	AUCUN	
WO 9219224 A	12-11-92	FR 2675997 A CA 2109424 A EP 0658099 A JP 6507165 T US 5352438 A	06-11-92 04-11-92 21-06-95 11-08-94 04-10-94
US 3637640 A	25-01-72	AUCUN	
US 3773929 A	20-11-73	AUCUN	
EP 437393 A	17-07-91	FR 2656874 A AU 641460 B AU 6922091 A DE 69114311 D DE 69114311 T ES 2080918 T IL 96779 A JP 4211366 A US 5179012 A	12-07-91 23-09-93 18-07-91 14-12-95 05-06-96 16-02-96 31-01-96 03-08-92 12-01-93
DE 2462631 A	27-03-80	FR 2225443 A FR 2240277 A AT 348320 B AT 339242 B AU 3055977 A AU 6791974 A BE 813485 A CA 1023285 A CH 619981 A CH 619731 A DE 2417508 A GB 1428898 A GB 1456496 A JP 50040785 A JP 58013147 B NL 7405019 A SE 7801041 A US 3997402 A	08-11-74 07-03-75 12-02-79 10-10-77 02-03-78 16-10-75 09-10-74 27-12-77 31-10-80 15-10-80 07-11-74 17-03-76 24-11-76 14-04-75 11-03-83 18-10-74 27-01-78 14-12-76

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 97/00603

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
DE 2462631 A		US 4029819 A ZA 7402287 A CA 1023286 A US 3920521 A	14-06-77 30-04-75 27-12-77 18-11-75
EP 628629 A	14-12-94	FR 2706465 A AU 6345994 A JP 7135970 A US 5536654 A	23-12-94 15-12-94 30-05-95 16-07-96
WO 9419493 A	01-09-94	CA 2157041 A EP 0686203 A JP 8510377 T	01-09-94 13-12-95 05-11-96
FR 2611495 A	09-09-88	AUCUN	